

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE HONDURAS

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

**Estudio de Monoaminas Cerebrales
en Presencia de Ciertas Drogas**

PARA OPTAR AL TITULO DE

Doctor en Medicina y Cirugía

PRESENTADA POR EL BR

Kenneth Vittetoe B.

Tegucigalpa M. D, C, Honduras, C. A
1970

Universidad Nacional Autónoma de Honduras

FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS

**Estudio de Monoaminas Cerebrales
en Presencia de Ciertas Drogas**

PARA OPTAR AL TITULO DE

Doctor en Medicina y Cirugía

PRESENTADA POR EL BR

Kenneth Vittetoe B.

Tegucigalpa M. D, C, Honduras, C. A
1970

ESTUDIO DE MONOAMINAS CEREBRALES EN
PRESENCIA DE SIERTAS DROGAS

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS
Tegucigalpa D.C. Honduras C.A.
1970

ESTUDIO DE MONOAMINAS CEREBRALES EN
PRESENCIA DE CIERTAS DROGAS

T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE DOCTOR EN
MEDICINA Y CIRUGÍA

KENNETH VITTETOEB.

ASESOR:

Dr. Virgilio Paredes Machado
Departamento de Ciencias Fisiológicas

PADRINO:

Dr. Francisco Alvarado.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE HONDURAS

Rector: Lic. Cecilio Zelaya Lozano

Secretario General: Lic., Victor M. Padilla

FACULTAD DE CIENCIAS MEDICAS

Decano: Dr. Jorge Haddad Q.

Vice-Decano: Dr. Enrique Samayoa

Secretario: Dr. Silvio E. Zuñiga

Pro-Secretario: Dr. Juan Almendarez

Vocal; Dr. Virgilio Cardona

1 Dr. Francisco Alvarado

Br. Humberto Maldonado R.

Br. José María Tercios

Br. Roberto P. Sosa

Br. Herminio Suazo V.

TRIBUNAL EXAMINADOR

Dr. Francisco Alvarado

Dr. Asdrubal Raudales

Dr. Juan Almendarez

DEDICATORIA

A mis padres Kenneth y Nora con el eterno reconocimiento y admiración de su hijo.

AGRADECIMIENTO

Gracias a la magnífica cooperación del Departamento de Ciencias Fisiológicas se pudo realizar el trabajo presentado en esta ocasión. Quedando siempre en deuda con el Dr. Francisco Alvarado y el Dr. Ramón Custodio quienes en todo momento brindaron su ayuda moral y científica solicitada.

En especial se hace patente que la piedra angular en el desarrollo experimental de este trabajo ha sido el Dr. Virgilio Paredes; su gran capacidad, su consejo siempre acertado y su reconocimiento científico en la materia son cualidades indispensables para la culminación exitosa de éste y los resultados obtenidos. Igualmente Gilberto Padilla cooperó en una forma decidida para realizar en este campo el máximo de labor posible.

Al resto del personal del Departamento de Ciencias Fisiológicas se le agradece su colaboración, pues de una manera u otra y en todo momento hicieron sentir su presencia.

Kenneth Vittetoe

INDICE

	PAGINA
DEDICATORIA	i
ADRADESIMIENTO	ii
LISTA DE FIGURAS Y CUADROS	iii
CAPITULOS:	
II.- INTRODUCCION	1-2
II.- CONSIDERACIONES GENERALES,-	
A) Revisión	3- 6
B) Neurotransmisores- Bioquímica	7- 9
C) Métodos de Estudio	10-21
III.- DESARROLLO EXPERIMENTAL	
A) Proyecto	22-24
B) Determinación de Aminas Cerebrales	
Materiales y Métodos	24-27
C) Resultados	28 -31
D) Transporte de Aminoácidos Cerebrales	
Materiales y Métodos	36-37
E) Resultados	38

...

	Pagina
IV. DISCUSION	41-44
V. CONCLUSIONES	45-46
BIBLIOGRAFIA	47-52

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

	Página
Figura 1 Estructura química de diversas drogas	6
Figura 2 Sistema activo de transporte de monoaminas cerebrales	9
Figura 3 Depósitos intracelulares de las monoaminas cerebrales	9
Figura 4 Metabolismo de la adrenalina y noradrenalina	11
Figura 5 Metabolismo del triptófano	12
Figura 6 Acción de diversas drogas en la senapsis del S.N.C.	12
Figura 7 Espectros de fluorescencia de extractos del cerebro	29
Figura 8 Curvas standard	30
Figura 9 Concentración de serotonina en cerebro de ratas controles y tratados con diversas fracciones de la calaguala.	34
Figura 10 Concentración de noradrenalina en ratas albinas normales y tratadas con diversas fracciones de la calaguala.	35
Cuadro 1 Acción fenotiazinica sobre las membranas celulares	19
Cuadro 2 Concentración de serotonina y noradrenalina en cerebro total de ratas controles y ratas tratadas con fracciones de calaguala.	32
Cuadro 3 Efecto de varias drogas sobre serotonina y noradrenalina de cerebros en ratas albinas.	33
Cuadro 4 El efecto de las fracciones de la calaguala y la reserpina en la incorporación de valina por hemicerebros	39
Cuadro 5 Efecto de las fracciones de la calaguala y reserpina en la incorporación y salida de valina en cerebro de ratas (in Vitro)	40

Desde el inicio de la historia los trastornos del comportamiento humano han sido extensamente estudiados, por los brujos y empíricos en un inicio que alcanza hasta el final de la edad media _f en donde se comienza una etapa más remunerativa con los que se dedican a escudriñar la mente del hombre en sus componentes más profundos, siendo los estudios de S. Freud (1895) los más destacados en el campo y que predominan hasta nuestros días. Posteriormente en forma científica se abordan los problemas mentales con la ayuda de sustancias que alteran el comportamiento psi-quico.

Desde 1952 con los estudios de Robitzek y Zeller en la rama de la psicofarmacología han venido a revolucionar los conceptos psiquiátricos modernos al descubrir que ciertas sustancias alteran el estado de animo y que estos cambios se deben a variaciones de la concentración de sustancias alojadas en el cerebro, llamadas Monoaminas específicamente en la zona límbica e hipotalámica, íntimamente ligadas a los instintos humanos.

En este estudio, nuestro interés inmediato fue el de conocer en forma mes íntima el mecanismo de acción de drogas psicofarmacológicas ya empleadas; posteriormente en vista de los resultados obtenidos por Horvath y col 1967, Horvath Paredes y Padilla 1969, llamó la atención el efecto de algunas de las fracciones de la cálaguala sobre el metabolismo cerebral y del organismo en general; además que el estudio sistemático de

esta droga abarca su utilización en pacientes seleccionados, es de interés el evaluar sus posibles efectos que esta pudiera tener, si los hubiere, al nivel del sistema nervioso central y su posterior utilización en forma aislada o combinada con sustancias de efecto psicofarmacológico conocidas, de acuerdo a los resultados obtenidos.

Este trabajo de tesis presenta un estudio sobre el efecto de diversas drogas y fracciones de la Calaguala sobre las concentraciones de las monoaminas cerebrales, como de la acción que puedan tener en el transporte de sus precursores, los aminoácidos a través de las membranas cerebrales.

II. CONSIDERACIONES GENERALES A. REVISIÓN:

Haciendo caso omiso de una introducción muy extensa en este estudio se hace un breve resumen de la evolución histórica de la adquisición de nuestros conocimientos psicofarmacológicos hasta la fecha.

El uso de estupefacientes sigue un camino paralelo a la historia de la humanidad con el objeto del simple afán, muy humano por cierto, de dulcificar la realidad de la vida. Hay escritos que datan del siglo VIII a.c. atestiguando el uso de HACHÍS, en civilizaciones Mesopotámicas. El opio según la leyenda griega fue entregada por Ceres (Diosa de la Agricultura) a los mortales para liberarlos de sus penas y dolores. Y la hoja Coca es el don legado por cierta Diosa Inca a los hombres para- "saciar los hambrientos, sostener a los débiles y hacer olvidar las desgracias." (Poldinger W, La Roche 1968)

En el Siglo XVIII pasan los estudios puramente empíricos de estas sustancias a un nivel si no científico más detallado, no es hasta 1773 que Albretch Von Haller hace un estudio científico de la acción Psico-trópica del opio al ser este médico presa de una dolorosa afección urinaria .

Independientemente en Francia Celse y después pero en el mismo año Lorri se percatan de la acción estupefaciente de los opiados y sus posi-

Bles beneficios en medicina clínica.

...

En 1883 Kraepelin publica el estudio titulado "Acción de Algunas Sustancias Medicamentosas sobre la Duración de ciertos Fenómenos Psíquicos sencillos". Siendo este trabajo el primer estudio científico sistematizado en la Farmacopsicología, palabra que introduce también el mismo autor en el lenguaje médico.

Desde principios de siglo y gracias al avance tecnológico de la ciencia vienen haciendo estudios bioquímicos de estas drogas y otras mas como el ácido dietil amido Lisérgico (L.S.D.) considerado como la sustancia más potente hoy en día en su clase. Descubierta por Albert Hoffman, Químico suizo en 1943.

El interés que han tenido estas drogas para la investigación médica estriba en la posible relación que hay entre los efectos de estos compuestos químicos, la distorsión del sentido de percepción, despersonalización, conducta alterada, euforia, depresión, ansiedad etc. Y los desordenes mentales. (Faillace L. A. 1966)

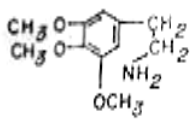
Para citar otro ejemplo es interesante la semejanza química entre la Mescalina y las Catecolaminas (Fig. 1) que llevó a Hoffer y col. a formular en 1954 las hipótesis que la esquizofrenia pudiera ser debida a

Alteración de productos metabólicos de la adrenalina y noradrenalina. Estos metabolitos alucinógenos serían el adrenocromo y adrenolutina.

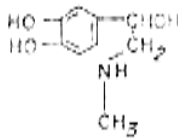
Esta teoría no se pudo comprobar a pesar de minuciosas investigaciones.

Por otro lado Wolly y Shaw (Wolley D.W., Shaw E. 1954) en el mismo año elaboran la teoría de que la esquizofrenia se debe a una alteración en el metabolismo de la serotonina basándose en el principio de que esta neurohormona y la mayoría de los alucinógenos conocidos tienen un común núcleo indol (F ig. 1) y sin embargo, la reserpina que se ha usado en psiquiatría por su acción antisicótica tiene este núcleo indol en su estructura, siendo un efectivo sedante que ya estaba usándose.

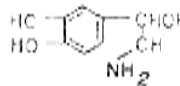
Desde hace unos 20 años la introducción de medicamentos en el terreno de la psiquiatría ha venido a revolucionar las viejas teorías de la psicopatología, iniciándose así un nuevo campo en esta rama de. La medicina conocida como la psicofarmacología, talvez la contribución más sobresaliente ha sido la de Robitzek y col. al descubrir el influjo de la iproniazida (Tuberculostático) en el estado de animo de los enfermos.



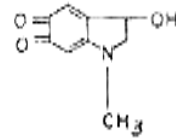
mescalina



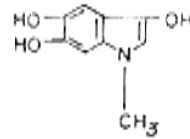
adrenalina



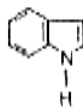
noradrenalina



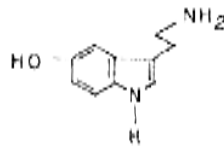
adrenocromo



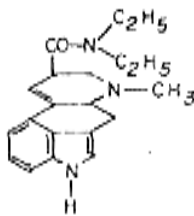
adrenolutina



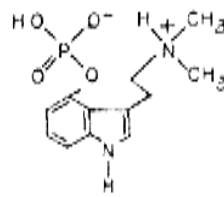
indol



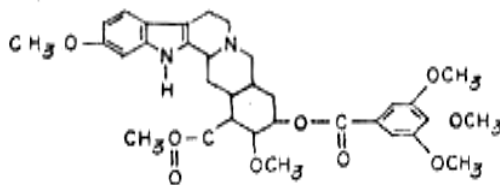
serotonina,
5-hidroxitriptamina



LSD₂₅,
dietilamida del ácido lisérgico



indocibina,
psilocibina



reserpina

y que dicho medicamento tiene- una acción inhibitoria de la mono amina-oxidasa (Zeller y Col 1952).

Desde entonces se ha venido investigando sistemáticamente y en forma muy intensa las diferentes posibilidades prácticas y teóricas que día a día aparecen en la literatura mundial.

Reconociendo la importancia de estos estudios para el psiquismo humano; lo reciente que es realmente el campo, y las muchas posibilidades de experimentación que faltan por investigar nos es difícil ser indiferentes al tema.

B. NEUROTRANSMISORES- BIOQUÍMICA

Durante el décimo Simposium de problemas actuales de psiquiatría desde el punto de vista biológicas, sociológicas y psicológicas en el año de 1960 llevado a cabo en Galesburg, Illinois; la Dra. M.Vogt presenta un tentativo de resumen de las posibles sustancias que intervienen como agentes fármaco dinámicos en el sistema nervioso central (S.N.C.) y que se encuentran distribuidos en forma característica siguiendo cierta norma situacional en el tejido cerebral de los mamíferos.

Todas estas sustancias son aminas o peptidos de pequeño peso molecular y las discute en el siguiente orden: (Vogt M. 1962)

Acetil colina, histamina, sustancia P, 5 hidroxytriptamina (Serotonina) el grupo de las catecolaminas - noradrenalina adrenalina y dopamina.

Ya para el año de 1967 y en un nuevo simposium celebrado en las clínicas psiquiátricas de la Universidad de Génova, los investigadores reunidos allí volcaron su atención sobre dos aminas de las antes mencionadas, que son específicamente las catecolaminas y la serotonina.

Son estas las monoaminas que nos interesa investigar y en especial las catecolaminas pues hasta donde hemos podido revisar de la extensa bibliografía, siguen siendo el blanco de experimentación de los laboratorios de psicofarmacología.

Metabolismo de Monoaminas en el S.N.C.

Las monoaminas son sustancias que se derivan por descarboxilación de amino-ácidos que tienen un solo grupo amino (Ácidos amino carboxílicos) y una de sus propiedades es servir de precursores en la síntesis de ciertas hormonas o sustratos de fermentos.

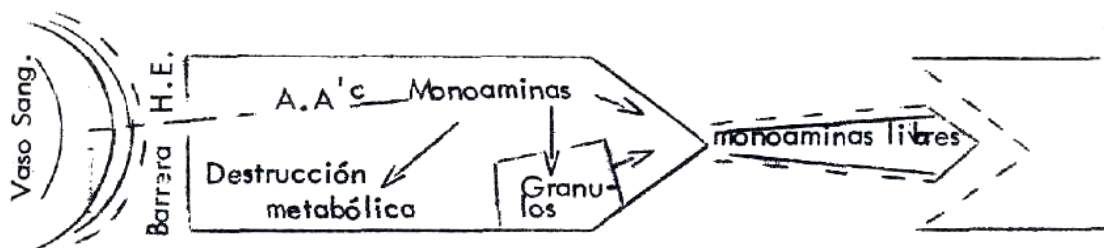
Las más importantes en el metabolismo cerebral son las catecolaminas y una indolamina-5-HT-

Hay que tener en cuenta, ante todo, que las monoaminas no pueden atravesar la barrera hemato-encefálica como lo pueden hacer los amino ácidos de los que se derivan por descarboxilación. Las monoaminas cerebrales

*.Symposium on Cathecolamines, Pharm. Review 1959

pueden concentrarse en unas granulaciones de terminaciones nerviosas libres que sirven como depósitos "pools" que son evidentes en la célula intacta (Pltcher et. al. 1960) por medio de un sistema activo de transporte (Figura 2) (Wurtman R, J, (1965)

FIGURA 2



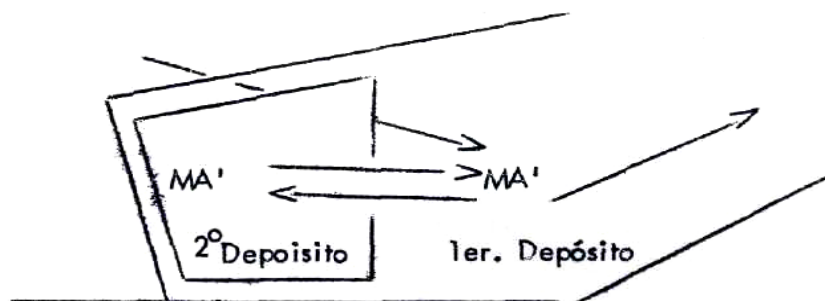
CÉLULA

TRANSMISIÓN

RECEPTOR

Se supone que estas granulaciones están en equilibrio con otro segundo depósito del cual las aminas son liberadas por un impulso nervioso de acuerdo con las necesidades fisiológicas (Fig. 3)

FIGURA 3



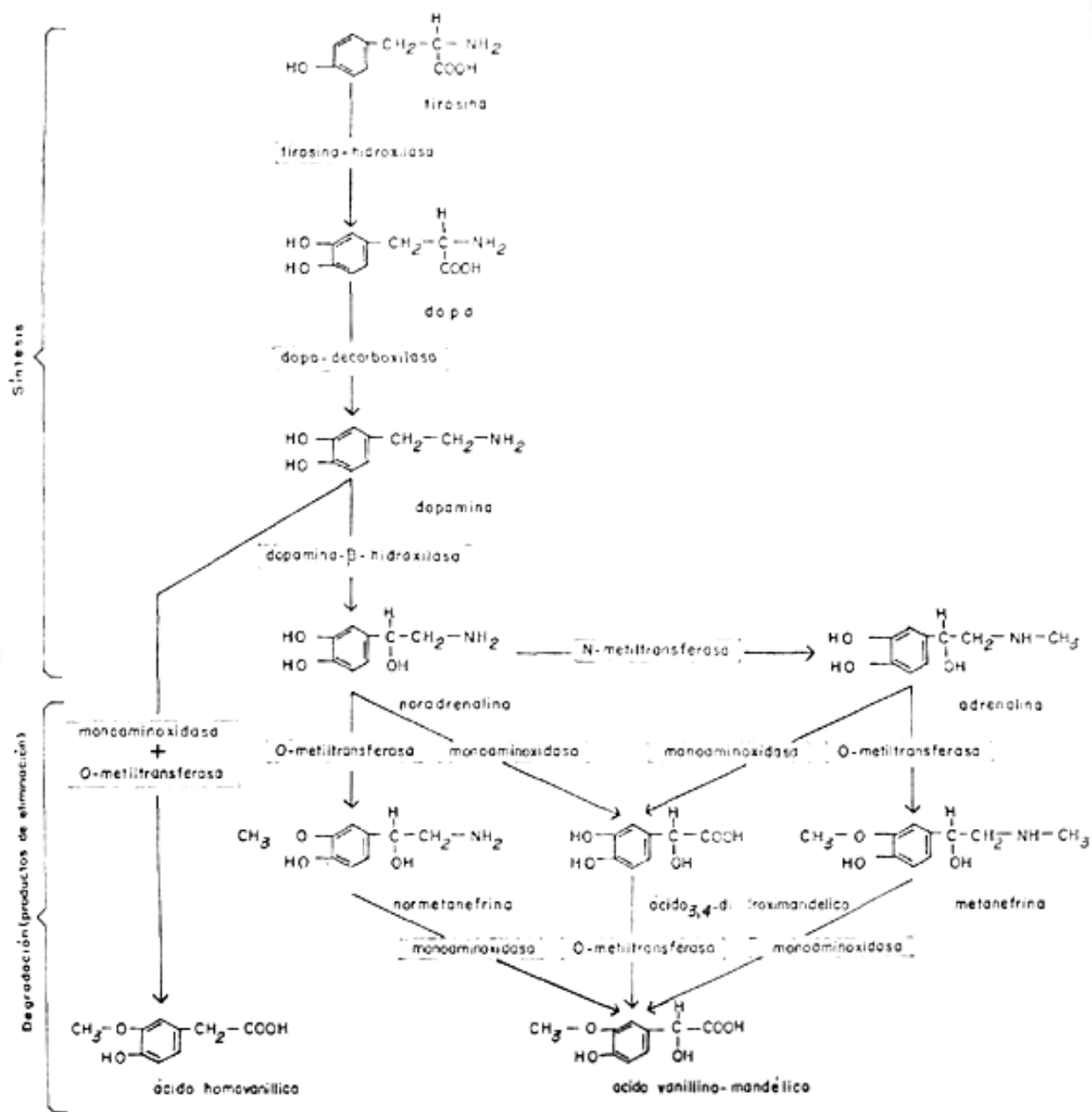
Y que el vaivén de activarse (al liberarse de los depósitos) e inactivarse (al depositarse) permite un equilibrado sistema de transmisión nerviosa central.

Las monoaminas libres de actuar en la sinapsis sufren degradación ulterior principalmente por desaminación oxidativa merced a la acción de una enzima que es la monoamina oxidasa, existen otras vías de degradación metabólica como es por medio de metilación a base de C-O-Metiltransferasa como fermento. Este último camino se le considera de gran importancia para degradar a la Nor-Ad y el primero se cree más afín a la degradación de AD. La figura 4 y 5 exponen en detalle el metabolismo de las aminas biogénicas AD, NOR-AD y 5HT.

Expuesto el punto de partida, para este estudio, que es en síntesis el metabolismo cerebral de los neuro transmisores de una manera simplificada, lleva el fin de hacerlo de *más* fácil comprensión. Debemos subrayar que estas cuestiones necesitan ser estudiadas más a fondo y que *los* procesos son sin duda alguna, más complejos y menos seguros de lo que pudiera imaginarse al solo ver el esquema.

C. MÉTODOS DE ESTUDIO.

Muchos y variados son los métodos empleados hasta la fecha para la investigación de las monoaminas cerebrales y claro está, que no vamos a



Metabolismo de la adrenalina y de la noradrenalina.

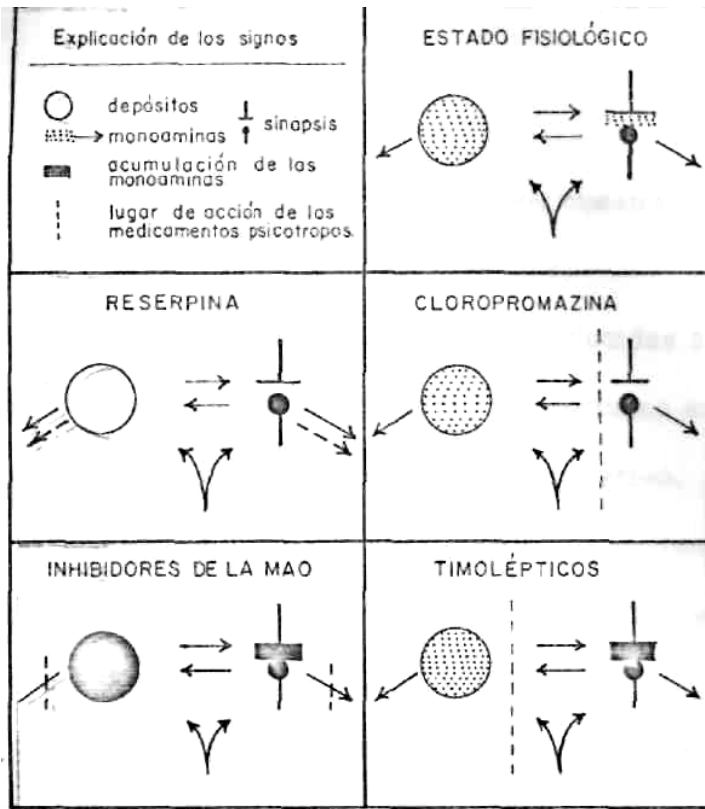
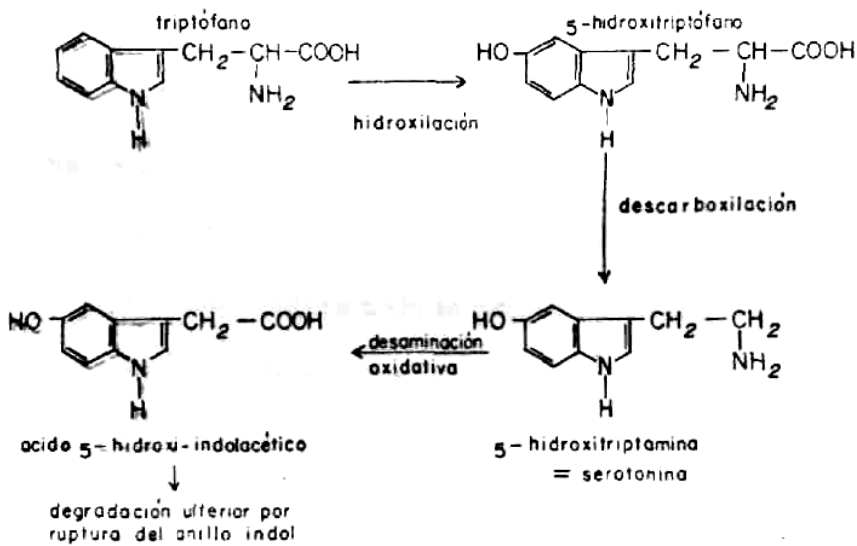


Figura 5



Revisarlos todos, sino que, concentraremos nuestra atención en las sustancias (drogas), técnicas y criterios actuales.

El estudio que por medio de sustancias inducidas a un animal de experimentación o un ser humano, producen alteraciones en el metabolismo cerebral de las monoaminas ha sido el más remunerativo. Varios tipos de drogas se usan en la actualidad y son valiosos implementos para estudiar el papel de las neurohormonas en la función cerebral y claro está en relación con las drogas usadas.

La evaluación de la acción de estas drogas se hace por medio de observar cambios en el comportamiento (animal o humano según el caso) y determinaciones cuantitativas in vivo e in vitro, principalmente por medio de técnicas especializadas i.e. espectrofluorometria.

Con respecto al primer tipo de evaluación debemos advertir que está siempre sujeta a la interpretación individual del que investiga, y pueden ser éstas obstáculo para la buena interpretación de resultados o que se nos dirija hacia investigaciones mal diseñadas.

La clasificación que hemos escogido en las alteraciones del metabolismo cerebral de las monoaminas bajo la acción de ciertos psicofármacos, sigue la propuesta por A. Pletscher y K. F. Gey (Hollister L. E. 1967) en base al supuesto modo de acción.

1.- Disminución en la capacidad de almacenamiento del tejido para las monoaminas

- a) Alcaloides de Rauwolfia, ie. Reserpina
- b) Derivados de la Benzoquinolizina ie. Tetrabenazine

Estos compuestos producen una marcada disminución de los niveles 5-HT, NAD, AD y Dopamina en el tejido cerebral, aumentando los productos de excreción urinaria (ie. 5 hidroxy-indol ácido acético, VMA), Los alcaloides de Rauwolfia tienen una acción que duran días (efectos de acción larga), las benzoquinolizinas, una acción de horas (período de acción corta).

Estas sustancias disminuyen de una u otra forma la capacidad de captación (por el tejido cerebral en este caso) de monoaminas.

En consecuencia las aminas almacenadas, al desprenderse y las recién formadas, producidas por continua descarboxilación endógena son almacenadas en las granulaciones aludidas en otra parte. Esta disminución en el sistema de almacenamiento induce a mayor excreción de metabolitos degradados por no estar protegidas las monoaminas de sus fermentos correspondientes y son rápidamente metabolizadas. En favor de esta teoría están los experimentos llevados a cabo por Hughes et.al. (1958) en plaquetas aisladas en las cuales la habilidad normal de este componente sanguíneo

de captar la 5-HX en grandes cantidades en un adecuado medio de incubación es abolido por la acción de la reserpina.

Hay evidencia, además, que la acción sedante de estos preparados están en relación directa con los cambios en el contenido de las monoaminas cerebrales. Al respecto (Brodie et. AL 1956) comprobaron que el efecto sedante de la reserpina y benzoquinolizinas paralelan la concentración de monoaminas y no las dosis suministradas de estos preparados y lo que es aun más, este efecto sedante se disminuye o se llega a abolir con la administración de sustancias que contra-restan la degradación metabólica; ie. Tratándose previo a la administración de sedantes con IMAO o la administración de DOPA en igual forma (Carlson Et Al 1957)

Se sabe también que los efectos colaterales de la reserpina de tipo extrapiramidal pueden deberse a disturbios en el metabolismo de las monoaminas cerebrales y en especial, con la dopamina, que está presente en altas concentraciones a nivel del núcleo caudado normalmente. La importancia de esto radica en la posible relación que hay con enfermedades de tipo extrapiramidal, por ejemplo, en un enfermo de Parkinson se encontró niveles anormalmente bajos de dopamina en el núcleo caudado (Ehringer y Horny kiewicz, 1960)

2.- Inhibición de la formación de Monoaminas

La descarboxilación de amino ácidos aromáticos (ie. 5-Hidroxy- Triptofan, Dopa) a las aminas correspondientes (5 hidroxy triptamina, y Dopamina) es inhibida por los amino ácidos metilados como -metil - 5 hidroxy triptofan, - metil - Dopa, -Metil~tirosina. Esta inhibición es reversible y competitiva (Sourke, 1954). In vivo estos compuestos provocan una disminución de 5 HT, Dopamina, y NAD en el tejido cerebral, hipótesis que ha sido ampliamente estudiada y recomprobada por varios investigadores. (Hollister L.E. 1967) (Melenan H. 1963). El punto donde ocurre esta inhibición sería lógicamente a nivel de las enzimas y específicamente las descarboxilasas. Ciertos autores (Roberts D.J. Broadley K. J. 1965) consideran que la descarboxilación de NAD y 5 HT se lleva a cabo por diferentes sistemas enzimáticos.

El efecto de este amino ácido sintético, también llamados precursores falsos por su analogía química, es transitorio y de poco valor psicofarmacológico. En la actualidad se está usando uno de ellos la A - Metil Dopa como droga antihipertensiva.

3.- Inhibición del metabolismo de las Monoaminas

A.- Inhibidores de la MAO

Drogas que inhiben la monoamina oxidasa in vivo pueden clasificarse en dos grupos:

a) De acción larga (inhibidores "irreversibles") ie-derivados de la hidrazina (iproniazida, izocarboxacid, feniprezina, niamide, etc.)

b) De acción corta { inhibidores "reversibles ") derivados de Harmane ie. harmine, hermaline.

Las dos clases de compuestos actúan sobre la enzima que cataliza la desaminación de las llamadas monoaminas a los correspondientes aldehídos (normetanefrina y aldehído de NAD) de allí que su principal efecto es el de:

1) El contenido de varias monoaminas endógenas (5 Ht, AD y Dopa - mina) se incrementa

2) El incremento producido por la administración de 5 hidroxy triptofan, Dopa etc. en monoaminas transmisoras es estimulado al administrar simultáneamente una inhibidora de las MAO.

El efecto benéfico en enfermos con depresión mental parece estar limitado a los derivados de la hidrazina que inhiben las MAO en el cerebro (in vivo), pues alteran el metabolismo "normal de estas monoaminas neurotransmisoras. Otros hallazgos de tipo experimental con inhibidores de MAO (fenilciclopropilamina, metil-benzil-propinil- amina) (Freidhoff A.J, 1960) que producen psico estimulación, acuerpan la teoría que por lo menos en parte, los cambios de conducta se deben a alteraciones en su metabolismo enzimático.

Por otro lado hasta la fecha no hemos encontrado una correlación, Experimental o teórica entre la inhibición de otras enzimas, (ie. Diamina oxidasa, descarboxilasas, difosfopiridinnucleotidasas) con efectos psicoestimulantes.

B-- Inhibidores de O - Metil-transferasa

Esta importante vía metabólica (Fig. 4) de desaminación oxidativa para las catecolaminas, ha sido ampliamente investigada y según las nuevas teorías (Poldinger w. La Roche 1968) es la vía de degradación más importante para la noradrenalina mientras que las monoaminas oxidasa degradan la adrenalina principalmente. Sin embargo, estudios con sustancias inhibitoras de las O-metiltransferencias (polifenoles del tipo pirogalol in vitro son inefectivas in vivo, y más bien pueden aumentar la concentración de catecolaminas cerebrales en el animal intacto muy ligeramente. (Crout et al 1960) Este fracaso de las alteraciones metabólicas por inducción de drogas del tipo antes mencionado -puede deberse entre otras posibilidades a la falta de penetración a través de la barrera hemato-encefálica.

4.- Interferencia con la penetración tisular de monoaminas. Ciertas fenotiazinas (clorpromazinas) y tioxantenes (clorprothixene) posiblemente inhiben los neurotransmisores aminicos y sus precursores

a través de acción directa sobre las membranas biológicas del cerebro. La evidencia de este mecanismo ha sido extensamente estudiado por varios autores, (Costa Et Al 1960 Ehringer Et. al. 1960 Gay y Plestcher 1961, Gey *ETC.* al. 1961 y Schwartz et al 1962) (Hollister LE. 1967)

La acción fenotiazinica sobre las membranas celulares se racionaliza de la siguiente manera y en base a los siguientes datos:

- a) En el cerebro las fenotiazinas antes mencionadas inhiben el aumento de 5HT y NAD causado generalmente por IMAO.
- b) Estas drogas contrarrestan la depresión que puede ocasionar la reserpina de 5HT, AD y Dopamina en el tejido cerebral, lo que es más, esto mismo ocurre al administrar derivados de las benzoquinolizinas (RO 4-1284), antagonizando la disminución de 5 Hidroxytriptamina.
- c) La clorpromazina inhibe la penetración de amino ácidos aromáticos precursores normales de las neurohormonas { 5-hidroxytriptofan "5-HTP" y Dopa) de la corriente sanguínea al cerebro y consecuentemente el aumento producido por 5 HT al administrar 5-HTP no ocurre.

CUADRO 1.

Pretratamiento	5HT/g	P
Ninguno	0.551	0.02
5 HTP	0.74-	0.02
Clorpromazina I 5 HTP	0.63	1 °_02 °_001

d) No hay evidencia hasta la fecha de que las fenotiazinas actúan inhibiendo las monoamino-oxidasa o descarboxilasas en el cerebro in vivo. Tampoco se ha demostrado que estas sustancias inhiban la penetración de los inhibidores de la MAO o liberadores de las monoaminas transmisoras.

Todos estos hallazgos sugieren que las fenotiazinas puedan inhibir la penetración de monoaminas desde y hacia los compartimientos de almacenamiento (vesículas granulares) (Singh P. Poirier, J. Baucher R. 1967) Además la penetración de precursoras de monoaminas a través de la barrera Hemato-encefálica es interferida por Clorpromazina. La reducción de la permeabilidad para las monoaminas explicaría también la velocidad de desaparición de ¹⁴C eperifrina en el animal intacto y la disminución de captación por varios órganos al administrar Clorpromazina simultáneamente (Wise C. D. , Ruelius H, W 1967) (Ansell G. B. Y Beeson M. F. 1968).

La clorpromazina y otros tranquilizantes mayores fenotiazinicos sedaran, entonces por disminución de las monoaminas en su sitio de acción (Sinapsis Neural) alterando las membranas celulares e intracelulares. 5.

D i v e r s o s

Existen muchas otras sustancias que actúan de una forma u otra sobre el comportamiento animal y deben incluirse en una sección especial, estas sustancias, las halucinógenas, tienden a producir respuestas de muy

•••

Variada índole. Todas estas drogas encabezadas por el ácido dietil amido-lisérgico (LSD-25) llevan el nombre de psicóticos químicos de tipo exógeno. Hollister (Maichel R. P. et. al. 1968) hace una buena clasificación en base de estructuración química, deplorando también las posibilidades y USDS actuales que tiene estas sustancias.

Dejaremos inconclusa esta sección por el momento pues se nos haría muy tedioso tratar de resumir las posibilidades teóricas y experimentales de cada una de ellas. A medida que nos adentremos en el tema y veamos la necesidad de elucidarlas, explicaremos lo que hayamos podido resumir del extenso arsenal bibliográfico que existe hoy en día al

A. PROYECTO.

Existe una abundante literatura sobre las drogas psicofarmacológicas, con respecto a su aplicación en clínica y las respuestas que se obtienen inmediatamente y efectos secundarios, sin embargo su mecanismo de acción es poco clara y precisa por los resultados contradictorios obtenidos por diversos investigadores de acuerdo a las técnicas utilizadas.

La clorpromacina o fenotiazinas en general parecen producir efectos tranquilizantes sin alterar la concentración de aminas cerebrales (Gey y Pletscher 1961), su efecto está relacionado con su concentración cerebral (Glowinski y Axelrod 1966), otros dicen (Carlsson y Linquist 1963) que su acción se debe a una activación compensadora de las neuronas monoaminérgicas después de bloquear otros receptores, además existen efectos muy sugestivos de una acción profunda sobre las membranas de permeabilidad (Guth y Spirtes 1964). Los derivados de los alcaloides de la Rauwolfia (reserpina) en sistema nervioso central son de tipo sedación profunda con características de duración prolongada disminuyendo la capacidad de la célula de almacenar norepinefrina y Serotonina (Brodie y Col. 1957), como de su posible acción a nivel de la incorporación de aminoácidos por el-cerebro (Lajtha y Toth 1965). Los inhibidores de

la amino-oxidasa (IMAO) comprenden un grupo heterogéneo de drogas que tienen en común la habilidad de antagonizar la desaminación oxidativa de las aminas biogénica y permitiendo que la norepinefrina se libere para ser más accesible fuera de la célula (Bunney 1965, Pscheidt 1964, Costa 1964 y Pletscher 1966) siendo utilizados para el tratamiento de la depresión, inhibiendo además muchas otras enzimas no relacionadas con las monoamino oxidasas (Giarman 1965), las drogas tipo imipramina (Tofranil) inhibe la concentración de monoaminas en los depósitos produciendo así aumento de monoaminas libres (activas) a nivel de sinapsis (Pletscher 1964) Ver figura No. 6 Página 12.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este laboratorio (Horvath y col. 1967) la fracción 4 de la Calaguala o Calagualina (glicosido) tiene un efecto claro sobre el transporte de membrana con respecto a aminoácidos incrementando su captación en células de tejido muscular y aumentando la síntesis de proteínas en todos los tejidos estudiados incluyendo cerebro; estudios posteriores { Horvath, Paredes y Padilla 1969) han evidenciado el efecto que las otras fracciones de la Calaguala tienen sobre la síntesis de proteínas y nucleoproteínas a nivel cerebral, encontrando que la fracción 4a (Cf4a) cuya estructura química es todavía desconocida aumenta en un 50% la síntesis de proteínas en experimentos agudos, en un 13%

La síntesis de proteínas en tratamientos crónicos de 8 días y un incremento

del 13% de la síntesis de nucleoproteínas en las mismas condiciones; CF5 (Hidrocarburo Cíclico) disminuye en 33% la síntesis de proteínas tanto en tratamientos agudos como crónicos, en cambio aumenta en tratamientos crónicos la incorporación de precursores a los ácidos nucleicos en un 223%. En el trabajo experimental reportado en esta tesis se determinó la concentración de Noradrenalina y Serotonina en tejido cerebral de rata en diversas condiciones experimentales utilizando métodos modernos de determinación espectrofluorométricas { Ansell y Beeson 1967) y además se estudia el efecto de las drogas sobre la incorporación de aminoácido marcado con carbono 14 en el tejido cerebral in vitro explorando así los posibles mecanismos de acción de estas sustancias, siendo los mecanismos de incorporación de aminoácidos en tejido cerebral in vivo igual que in vitro (Levi y Amaducci 1967).

B) MATERIAL Y MÉTODOS.

Todos los reactivos fueron suplidos por Laboratorios Merck { gradoanalítico), L-Noradrenalina y Serotonina Creatin Sulfato fueron utilizados como standard. Tofranil o Clorhidrato de N-(*dimetilamino*- propil) iminodiben-cilo fue suministrado por J.R. Geigy S. A., IMAO o 1 Bencil-2-(5 metil-izaxolocarbonil) -hidrazina por F. Hoffman-La Roche & Cíe, S, A. y el Clorhidrato de Promacina por los Laboratorios **Wyeth** Inc. y la Reserpina fue obtenido

de la Sigma Chemical Co. El agua fue edestilada en un sistema de vidrio y deionizada inmediatamente antes de su uso.

Se utilizaron ratas albinas machos de 150 a 200 gramos de peso y durante todo el tratamiento fueron dejadas "ad libitum", Las dosis administradas de las diferentes fracciones de la Calaguala aparecen en la leyenda de las figuras y fueron administradas por vía oral, mediante sistema de intubación. Las mismas fueron suplidas por la sección de análisis químicos de este Departamento.

La técnica fluorométrica para la medición simultánea de Serotonina y Nora-drenalina en la misma muestra de tejido, fue el sugerido por Ansell y Beeson (1963), quienes combinaron la técnica de Chang (1964) para la determinación de Catecolaminas con la técnica de Vanable (1963) y Snyder, Axerod y Zweig (1965) para Serotonina.

1.- Extracción de Monoaminas del Cerebro en Rata.

Las ratas fueron sacrificadas por decapitación y el cerebro total (exceptuando cerebelo) fue rápidamente removido (aproximadamente 2 minutos). Los tejidos pesaron alrededor de 1.200 mgs.

Cada muestra fue homogenizada en 10 volúmenes de butanol-ácido en un homogenizador del tipo de Potter-Elvehjem (Pistilo de Teflon-tubo de vidrio: 0.1-015 mm de espacio interno) El butanol-acido, el tubo homogenizador y el pistilo fueron guardados a 4° hasta su uso. El homogenizador fue transferido a tubos de centrifuga y centrifugados a 1000 g. por cinco

minutos (centrifuga Refrigerada International, Modelo HR-1) Una alícuota (5.0 ml) fue transferido a un tubo conteniendo una mezcla standar de noradrenalina y serotonina, 500 nanogramos de cada uno. Agitados en un agitador mecánico por dos (2- minutos'... Se le agregó 10 ml de 2, 2,4-trimetilpentano (Isoctano) y 5,0 ml de agua, agitados por 2 minutos y centrifugado a 1000 g. durante 2 minutos, (El cambio de n-heptano comunmente usado por iso-octano fue sugerido por Crawford y Rudd 1962).

La fase orgánica, incluyendo el disco de tejido en la interfase acuosa/orgánica fue removida por aspiración y descartada. Una alícuota de 4.5 ml fue transferida a un tubo conteniendo 1 ml de solución de acetato de sodio 2M y 0.2 gramos de alumina (pH entre 4y5). Esta mezcla fue agitada por 5 minutos y luego centrifugada por 5 minutos a 2000 g.

2. Extracción de Monoaminas

SEROTONINA: 5,0 ml del líquido sobrenadante fue transferido a un tubo conteniendo 11.0 ml de butanol, 1,0 ml de tampón borato pH 10 y 3.0 gramos de cloruro de sodio. La mezcla fue agitada por 10 minutos y centrifugada brevemente. La fase butanólica (10 ml) fue agitada por 2 minutos con 15 ml de iso-octano y 2,0 ml de tampón fosfato 0.05M a pH 7.0. Después de la centrifugación por 2 minutos a 1000g. , la fase orgánica superior fue removida por aspiración.

NORADRENALINA: El líquido residual sobre el tubo conteniendo alumina se descartó y la alumina lavada por agitación con 2 ml de agua y luego centrifugada a 2000 g por 5 minutos. Después que el lavado líquido fue descartado y las paredes del tubo fueron secados Con papel filtro

La alumina fue entonces agitada por 5 minutos con 0,8 ml de tampón fosfato 0.5 M a PH 6.5 fueron centrifugadas nuevamente durante 5 minutos a 2000 g.

3. Productos de Fluorescencia:

SEROTONINA: Una porción de la fase acuosa del extracto fue agregado a 0.1 ml de Ninhidrina de preparación fresca y calentada durante 30 minutos a 75.

Un blanco y un standard se hizo al mismo tiempo. Los tubos fueron enfriados y dejados por lo menos 1 hora a temperatura ambiente antes de leer. La fluorescencia fue leída en un Espectrofluorómetro Zeiss P MQII con cuvetas de cuarzo de 1.0 mm. Las lecturas se hicieron a 495 m μ , usando un filtro de activación de 375° m μ . La abertura de activación y emisión fue colocado a 1.0 mm y el ancho de la abertura del foto tubo a 2.0 mm. La amplitud fue de 10/10/TI.

NORADRENALINA: Una porción de (0.5 ml) del fluido de la alumina fue mezclado con 0.05 ml de reactivo EDTA 0.1 M; reactivo de yodo 0.1 N fue añadido. Después de exactamente 2 minutos se añadió 0.1 ml de sulfito alcalino preparado fresco, seguido de 0.1 ml de ácido acético 6N, 2 minutos después. Un blanco y standard fue hecho de la misma manera. Inmediatamente fue colocado en un baño de 100° durante 2 minutos, rápidamente enfriado y añadido 1 ml de agua. Las longitudes de onda de activación y emisión fueron colocados a 374 m μ y 485 m μ , respectivamente. El producto de fluorescencia fue medido. Las aberturas y amplitud fueron las mismas de las descritas para Serotonina.

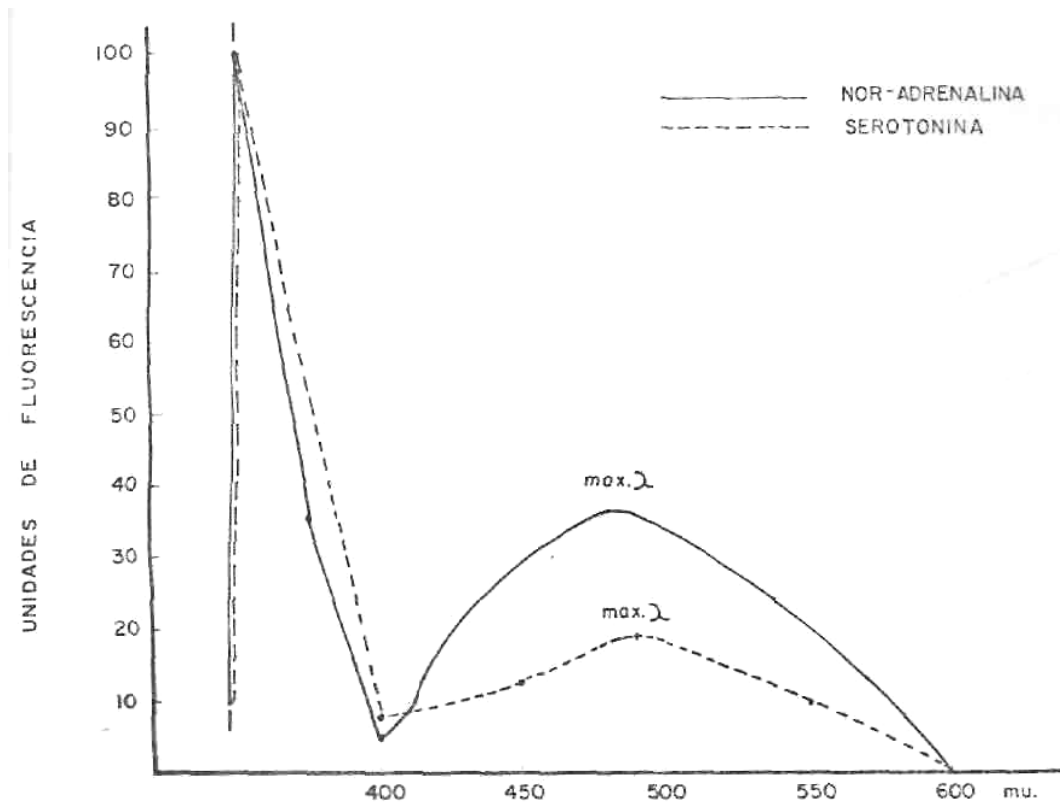
RESULTADOS,

La técnica espectrofluorométrica de Ansell y Beeson (1968), requería el determinar el espectro de excitación y emisión de las sustancias en estudio (fig 7), noradrenalina y serotonina, obteniéndose una absorbancia máxima de excitación alrededor de 375 mμ para ambas sustancias; y la absorción máxima de emisión de 485 mμ para la noradrenalina y 495 mμ para la serotonina (5-Hidroxitriptamina); se realizó en extractos de cerebro de ratas en experimentación y está de acuerdo a los espectros de fluorescencia encontrados por varios autores.

Las curvas Standar (Fig 8) demuestran que las monoaminas determinadas, su reacción de producción de fluororos es lineal a lo menos entre los límites de 100 y 1500 nanogramos. Las muestras utilizadas contenían una concentración de serotonina y noradrenalina correspondiente a la mitad de los límites de tolerancia. Con nuestra técnica, blancos muy bajos fueron obtenidos.

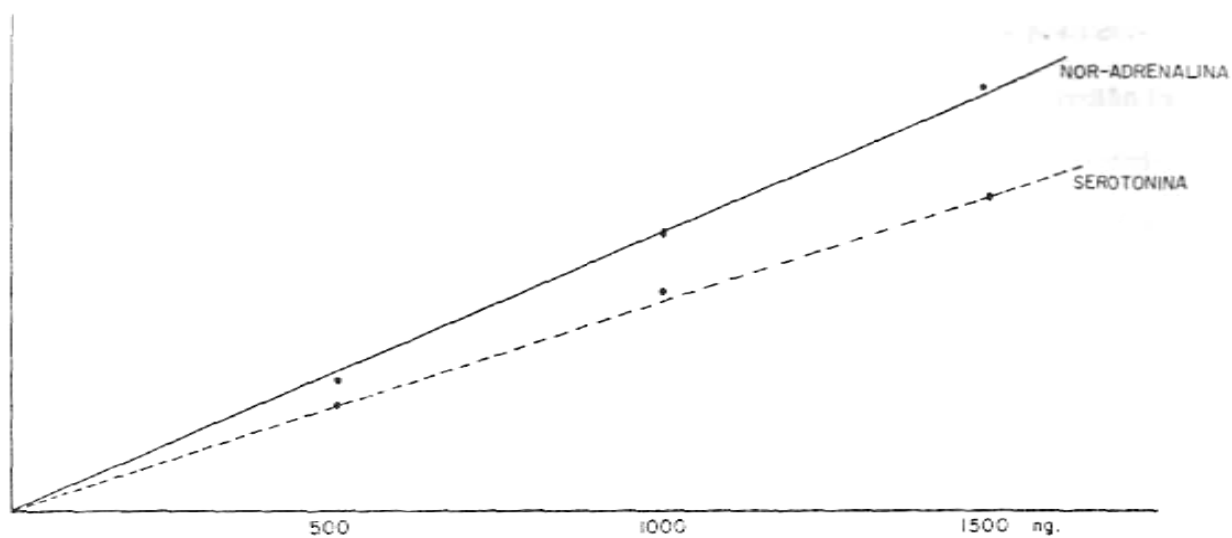
La sensibilidad del método, medido por la cantidad de cada amina la cual necesita estar presente en la muestra de tejido original para dar una lectura lineal correspondiente al doble de la lectura del blanco fue de 20 ng. Para la noradrenalina y 30 ng. Para la Serotonina.

La recuperación fue del orden del 60 al 65 % para cada amina y fue lineal por lo menos hasta abajo de 100 ng.



ESPECTRO DE FLUORESCENCIA EN EXTRACTOS DE CEREBRO DE RATA

Figura 8



Los standard fueron realizados mediante la extracción de muestras conocidas de acuerdo a Métodos. Se leyó en el Espectrofluorometro Zeiss PMQ II con una amplificación de 10/10/II

El cuadro 2 muestra la concentración de serotonina y noradrenalina en animales de laboratorio en condiciones diversas de tratamiento; C3rebro total se utiliza con excepción del cerebelo en vista de su bajo contenido de monoaminas (Maickel y Col 1967).

La reserpina disminuye la concentración de ambas monoaminas en un período de cuatro horas después de un tratamiento de 1 mg /Kg. de peso corporal vía intraperitoneal; el CF4 o calagualina solo altera la concentración de noradrenalina en tratados agudos, sin observarse cambio alguno en períodos de 24 horas de tratamiento y ni en períodos más prolongados hasta de 6 días (Fig. 9); el Cf4_a no produce cambios sobre las concentraciones de serotonina y en cambio disminuye las concentraciones de noradrenalina en todos los tiempos de tratamiento(Cuadro 2 Fig. 9); la fracción 5 de la calaguala o CF₅ sin alterar los niveles de la tasa de noradrenalina cerebral, disminuye la concentración de serotonina en animales tradados agudos, sin embargo ya a las 24 horas de tratamiento se observa un aumento sobre los valores normales, efecto que va aumentando en forma progresiva a *lo* largo de 6 días de tratamiento utilizados en nuestro diseño experimental (Fig. 10).

Los resultados del cuadro 3 muestran en los tratados de tofranil en experimentos de 1 hora un aumento de las concentraciones de serotonina y Noradrenalina, este efecto desaparece a las 24 horas de tratamiento. Combinado con CF4 un aumento aun mayor de los niveles de Serotonina en experimentos agudos. Ningún otro efecto estadísticamente significativo se ha observado con las otras drogas estudiadas o combinadas con la fracción 4 de Calaguala,

CUADRO 2
**CONCENTRACION DE SEROTONINA Y NORADRENALINA EN CEREBRO TOTAL
 DE RATAS CONTROLES Y RATAS TRATADAS CON FRACCIONES DE
 CALAGUALA**

AMINAS	CONTROL	CF		RESERPINA
		4	5	
		4a.	5	
		CF	CF	
		1 H O R A	4 H O R A S	
SEROTONINA	0.67 [±] 0.04(10)	0.62 [±] 0.04(6)	0.53 [±] 0.04(5)	0.49 [±] 0.04(4)
		24 H O R A S		
		0.63 [±] 0.07(6)	0.82 [±] 0.05(5)	
NORADRENALINA	0.61 [±] 0.03(10)	0.51 [±] 0.05(6)	0.60 [±] 0.05(5)	0.42 [±] 0.07 (4)
		24 H O R A S		
		0.61 [±] 0.05(6)	0.70 [±] 0.06(5)	

Las ratas fueron sometidas a una dosis única por vía oral de 1 mg/gramo de peso corporal de CF4 y CF5, 0.1 mg/gramo de peso corporal de CF 4a. y 1 mg/kg. de peso corporal de Reserpina por vía Intra peritoneal; el contenido de las aminas cerebrales fué determinado de acuerdo a la técnica de Ansell y Beeson (1968).

Las cifras representan microgramos/gramo de peso fresco de cerebro y la desviación standar de las mismas es reportado.

El número de determinaciones es dado entre paréntesis.

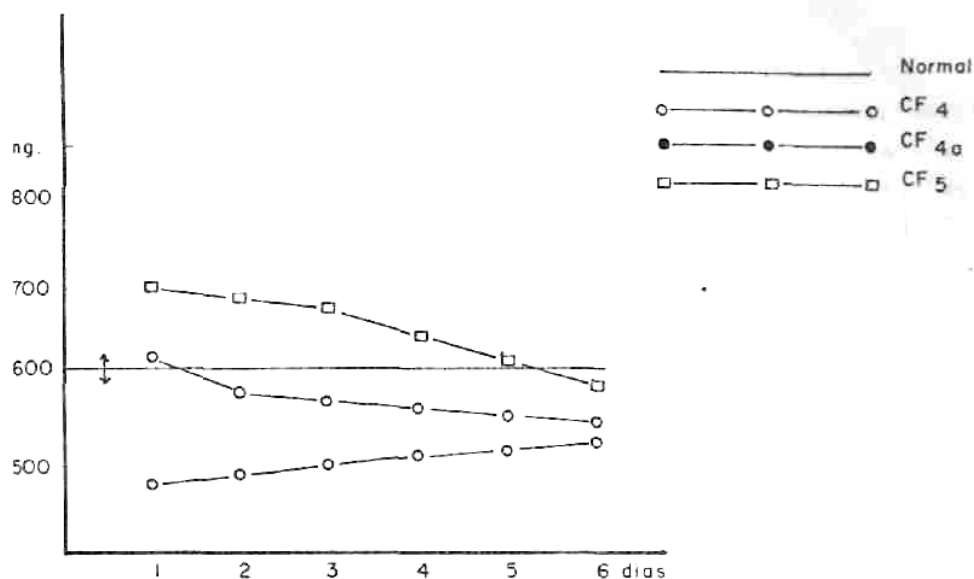
CUAERO 3

EFECTO DE VARIAS DROGAS SOBRE SETORONINA Y NORADRENALINA
DE CEREBROS EN RATAS ALBINAS

AMINAS	CONTROL	TOFRANIL	TOFRANIL-CF ₄	IMAO	IMAO-CF ₄	CLORPROMAZINA
SEROTONINA	0.67	1 H O R A				
		0.90	1.49	0.61	0.61	0.66
	0.67	24 H O R A S				
		0.67	0.61	0.60	0.73	
NORADRENALINA	0.61	1 H O R A				
		1.03	0.91	0.62	0.67	0.59
	0.59	24. H O R A S				
		0.59	0.59	0.67	0.54	

Los animales fueron sacrificados 1 y 24 horas después de Tefranil, Clorhidrato de N, (p- dimetilamino-propil) - iminodibenzil (1mg. i. g. oral) e IMAO 1-Becil - 2- (5Metil-Isoxazolilcarbencil) -hidroquina (0.25 mg/kg, oral). Promocina: (10mg/kg.ip.) 6 CF₄ (1mg. g, oral)

La determinación se hizo de acuerdo a métodos. El valor control es el promedio de 10 animales. - desviación standard de 0.05, el resto de los valores es el promedio de 2 a 3 animales. Las cifras representan microgramos/gramo de peso fresco de cerebro.

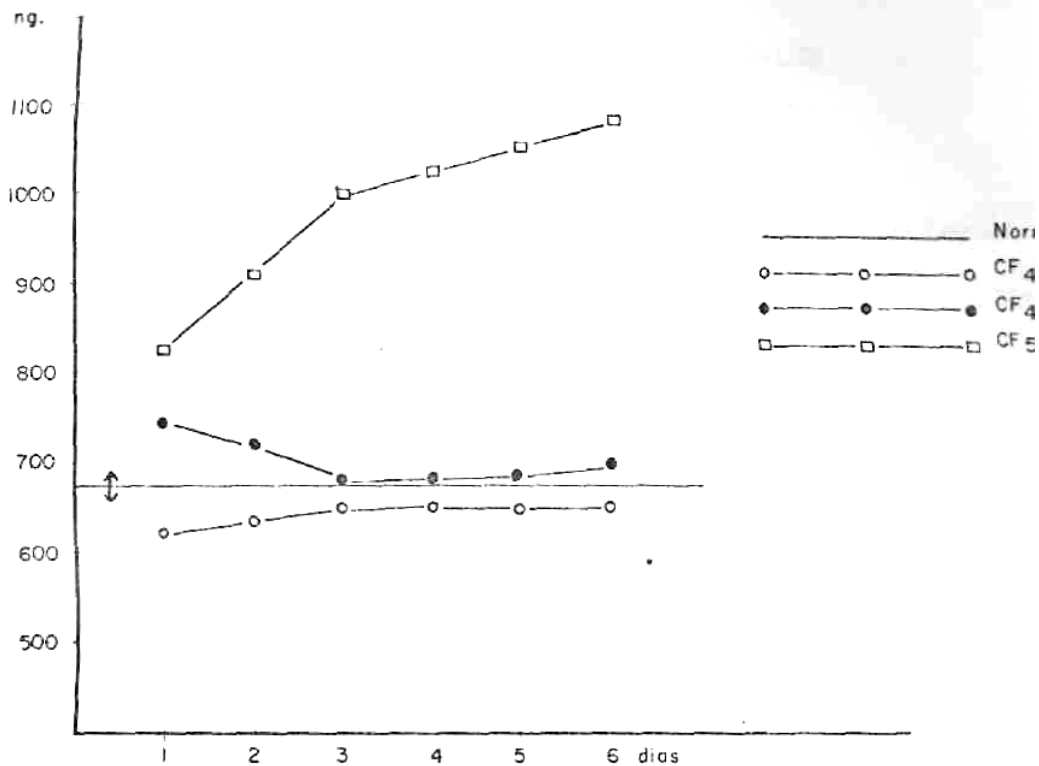


CONCENTRACIÓN DE NORADRENALINA EN RATAS ALBINAS NORMALES Y TRATADAS CON DIVERSAS FRACCIONES DE LA CALAGUALA_D

Las ratas tratadas por vía oral 1 mg/gramo de peso corporal con CF₄ y CF₅, 0,1 mg/gramo de peso corporal de Cf_{4a} se determinó la concentración mediante técnicas referidas en Métodos,

Los resultados se expresan en concentración de Noradrenalina en nanogramos/gramo de cerebro en diversos días de tratamiento

La flecha representa el error standard de la media de los resultados controles.



CONCENTRACIÓN DE SEROTONINA EN CEREBROS DE RATAS CONTROLES Y TRATADOS CON DIVERSAS FRACCIONES DE LA CALAGUALA.

Las ratas de un peso de 150 a 200 gramos fueron tratadas por vía oral con 1mg/gramo de peso corporal 1/ día con CF y CF₅, y 0.1 mg/gramo de peso corporal 1/día con Cf_{4a}; y sacrificadas 24 horas después de la última dosis o Se determinó su concentración de acuerdo a métodos.

Los resultados son expresados en nanogramos/gramo de peso fresco de cerebro a diferentes tiempos de tratamiento.

Las flechas en línea control indican el error standard de la media.

TRANSPORTE DE AMINOÁCIDOS CEREBRALES

D. Materiales y Métodos.

Ratas albinas machos, jóvenes de 50 gramos de peso corporal fueron usadas. Los aminoácidos no radioactivos fueron suministrados por E. Merck y los marcados con Carbono 14 de la casa New England Nuclear.

Los animales después de un ayuno de 16 a 18 horas fueron sacrificadas por decapitación y el cerebro rápidamente removido. Una mitad del mismo fue utilizado como control y la otra con la sustancia en estudio. Los experimentos in vitro fueron realizados de la manera siguiente: Los tejidos fueron colocados en un frasco conteniendo 5 ml del medio de incubación a

■370

durante tiempos determinados de acuerdo al experimento y con corriente Continua de una mezcla de O_2 - CO_2 (95-5%). El medio standard de incubación contenía lo siguiente: $ClNa$ 128mM, Cl^2 Ca 2.7 mM, ClK 5mM, SO_4 Mg. 1.2mM, PO_4H_2A 7.5 mM, Tris 75mM, tamponado a pH 7.4 con adición de glucosa 10 mM y aminoácido (C^{14}) 2 mM (a menos que se especifique diferente). La concentración de las sustancias en estudio se denotan en las leyendas de las tablas correspondientes.

En experimentos de "Estado Estable" los hemiserebros fueron dejados en incubación durante 70 minutos. En los que se midió la velocidad inicial de incorporación se dejaron los tejidos en pre-incubación en un medio libre de aminoácidos durante 20 minutos; medio contenido aminoácidos (CI 4)

Fue agregado para dar una concentración final del aminoácido de 2nivi y se dejó durante 3 minutos.

En los experimentos de incorporación y salida de aminoácidos los tejidos cerebrales fueron incubados durante 30 minutos en medio de incubación. Los hemisferios (400 mg) fueron divididos en dos partes, una se utilizó para medir la incorporación y la otra mitad se colocó en un medio de incubación libre de aminoácidos durante 20 minutos (salida). El medio se renovó a los 10 minutos para mantener negligible la concentración de aminoácidos en el medio de incubación. En cualquiera de los casos la muestra fue ligeramente secada en papel filtro e inmediatamente fueron congelados en hielo seco, pesados y homogenizados con 10 volúmenes de ácido perclórico 0,35 N. se centrifugó y una alícuota del extracto fue tomado y colocado en una plancheta no oxidable con anillos concéntricos (4,9. cm²), el cual se secó bajo una lámpara infraroja.

La radioactividad fue medida en un contador de gas de la Baird Atomic.

La concentración de los aminoácidos fue calculado de la radioactividad específica del medio y de la radioactividad de los tejidos y expresada como micromoles por mililitro de agua intracelular y en general fueron calculados en base a un contenido de agua del 80 por ciento.

E) RESULTADOS

Con el objeto de comprender el efecto que las sustancias en estudio puedan tener sobre el transporte a través del sistema barrera cerebral de aminoácidos en general, y establecer probables mecanismos que expliquen los efectos observados en las concentraciones de monoaminas cerebrales cuyos precursores metabólicos son aminoácidos, se estudió la incorporación del aminoácido nuestro natural, Valina, y en base a que la acumulación del estado estable representa un complejo proceso, el cual es determinado por la extensión relativa de dos procesos unidireccionales de influjo y eflujo (Lajtha A. y Col. 1968, Levi G. 1968), el proceso fue estudiado en forma separada, la acumulación en estado estable y la salida de aminoácidos de tejido cerebral.

La acumulación en estado estable del aminoácido valina en cerebros en medio incubación (Cuadro 4), se observa una disminución con todas las fracciones estudiadas, la reserpina produce un efecto similar y al medir la velocidad inicial de incorporación (Influjo) se observa el mismo efecto comparado con los controles, con excepción del CF5 que no experimenta cambio alguno.

La salida de Valina de cerebro pre-incubado (.flujo), en un atedio libre de aminoácidos (Cuadros) muestra diferencias significativas; de inhibición con el F4a y de incremento con las fracciones 4 y 5 de la Calaguala y de Reserpina.

EL EFECTO DE LAS FRACCIONES DE LA CALAGUALA Y LA RES. RPINA EN LA

INCORPORACIÓN DE VALINA POR HEMICEREBROS

	ESTADO ESTABLE* DE INCORPO- RACIÓN. %	INHIBICIÓN DE INCORPO- RACIÓN. %	VELOCIDAD INICIAL**	INHIBICIÓN DE INCORPO- RACIONA
CONTROL	645-28	40-4		
CF ₄	538-30	17	27-3	32
CF _{4a}	520-40	20	22-5	45
CF				
5	428-22	34	41-5	--
RESERPINA	250- 50	30	21-3	48

En experimentos de estado dos estable los cerebros se dividieron en mitades (Control y tratado in vitro) fueron encubados por 70 minutos a 37° en una atmósfera de O₂-CO₂ (95%-5%) en 5 ml de tampón krebs-Ringer conteniendo inicialmente valina C 14 2 nM

En los experimentos de incorporación inicial los hemicerbros fueron preincubados por 20 minutos en tampón krebs-Ringer en las mismas condiciones: luego se agregó Valina Q 14 en concentración necesaria para dar una concentración final de 2 nM. y se incubó durante 3 minutos Las diversas fracciones de la Calagualla se agregaron al medio en una concentración de 1 mi/ ml y la reserpina 10 3 M,

* La acumulación de aminoácidos se expresa en umoles/ml de agua intracelular siendo Calculado en base a un 80% del contenido de agua por el cerebro después del experimento. Pro medio de tres experimentos con 1 Desviación Standard es presentado.

** Estas cifras indican umoles/ml de agua intracelular/ minuto.

EFFECTO DE LAS FRACCIONES DE LA CALAGUALA Y RE3ERPINR EN LA INCORPORACIÓN Y SALIDA DE VALINA EN CEREBRO DE RATAS (in Vi tro)

CONDICION	INCORPORACION*	SALIDA	% DE PERDIDA**
Control	149 ± 11	45	27 ± 2
CF ₄	144 ± 9	61	42 ± 3
CF _{4a}	148 ± 12	34	22 ± 2
CF ₅	128 ± 10	50	41 ± 3
RESERPINA	135 ± 11	44	33 ± 1

El cerebro de las ratas fue dividido en dos partes, una representó el control y la otra se le agregó la sustancia correspondiente, fueron preincubados por 30 minutos a 37° en tampón de Krebs-Ringer conteniendo aminoácido marcado C¹⁴. Luego la mitad fué utilizado para medir la incorporación (este es el nivel en el cual la salida se comenzó); el resto fué colocado en medio libre de aminoácidos durante 20 minutos más en incubación.

Se usaron las mismas concentraciones que el experimento de las sustancias estudiadas anteriormente.

* Los resultados se reportan en umoles/ml de agua intracelular y son el promedio de 3 experimentos con 1 DS.

** Calculado de acuerdo a los siguiente: $\frac{\text{Concentración intracelular después de la salida}}{100} \times 100$
 Concentración intracelular antes de la Salida.

IV. DISCUSION

La Noradrenalina y Serotonina representan hasta la fecha y según la extensa bibliografía revisada, los neurotransmisores de mayor importancia del sistema nervioso central, sin menospreciar el papel que desempeñan otras sustancias al mismo nivel, como ser, la dopamina, la acetilcolina, histamina, sustancia P y otros (McLennan H. 1963)

La concentración de monoaminas cerebrales medidas en cerebro de animales controles son un 15% mayor a las dadas por la literatura, posiblemente por una mayor sensibilidad de la técnica ó por variaciones en la concentración según las condiciones ambientales en que se realizan los experimentos, como lo hiciera notar Montagu 1959, Beavallet y Col. 1962»

Los resultados obtenidos por los psicofármacos utilizados en nuestra experimentación y de uso general en clínica, son bastantes similares a los reportados por otros autores (Gey y Pletscher 1961, Brodie y. col 1967, Lajtha y Toth 1965, Bunney 1965, Pscheidt 1964, Costa 1964, Pletscher 1966); es de hacer notar la inhibición de la incorporación de valina in vitro en presencia de reserpina, este tipo de inhibición es causado por otras drogas (Lajtha y Toth 1965) y puede explicarse en base a la interferencia con el suministro de energía en el cerebro o la interacción con constituyentes de la membrana.

Además la Imipramina o Tofranil, en experimentos agudos (Una hora) eleva la tasa de Monoaminas cerebrales estudiadas, lo que aún no ha sido reportado por otros investigadores, y el hecho de que esta elevación no se demuestra en experimentos crónicos, puede ser explicado en base al diseño experimental seguido por nosotros; lo que da lugar a posibilidades de estudio en cuanto a su mecanismo intimo de acción poco conocido, en períodos agudos de tratamiento.

Las diversas drogas utilizadas en nuestro estudio, nos muestran diferentes efectos sobre los niveles de Serotonina y Noradrenalina; es de notar la significativa elevación de Serotonina en los animales tratados con CF₅ persistiendo en forma progresiva a lo largo del tratamiento (seis días) sin alterar los niveles de la otra amina; el transporte del amino ácido Valina radiactivo a través de membrana, nos muestran una disminución de sus niveles en el interior celular en estado estable, esto puede ser alterado por una disminución en su incorporación, un aumento de su salida o un mayor metabolismo de los mismos; observamos una disminución de su metabolismo (la síntesis de proteínas en tratados agudos y crónicos disminuye en un 33% , Horvath, Paredes y Padilla 1969) y un aumento de su salida en cerebros in vitrio (52%). Esto puede ser explicado nuevamente por una interferencia con las fuentes de energía celular o bien mediante una interacción con el sistema selectivo de barrera encefálica, que de acuerdo a

Guroff y Udenfriend 1962 y Guroff y Col 1961, quienes indican que la incorporación de algunos aminoácidos, son estereoselectivos y **que** BU incorporación se inhibida por ciertos otros aminoácidos, de donde se hace necesario el estudio posterior del transporte del aminoácidos aromático precursor de la serotonina, el triptofano.

La fracción 4_a de la Calaguala (Cf4a) disminuye en forma selectiva la amina noradrenalina en todos los períodos de tratamiento in vivo estudiado. El estudio individual de transporte de aminoácidos no es indicativo de si la droga actúa a nivel de transporte o a nivel de metabolismo de los mismos; el Cf4_a disminuye la acumulación en estado estable junto con un incremento de la velocidad de recambio de la síntesis de proteínas cerebrales, 50% en experimentos agudos y 13% en crónicos (Horvarth, Paredes y Padilla 1969). Su efecto sobre la acumulación del aminoácidos puede explicarse en base al incremento de síntesis de proteínas pero no deja claro lo observado con la noradrenalina, para lo cual será necesario experimentos posteriores sobre el metabolismo mismo de la amina.

El CF4 no tiene ningún efecto significativo sobre los niveles de las monoaminas estudiadas, combinado con Trofanil se ha observado un incremento del efecto de esta en forma aislada, esto no se explica por los otros experimentos realizados.

Los resultados discutidos en el presente estudio muestran que las diferentes drogas utilizadas modifican los niveles de-ciertas sustancias intracelulares

del cerebro. Este efecto no se realiza mediante el mismo mecanismo, ya que puede alterar el proceso de transporte, la permeabilidad de las membranas, el contenido de las fuentes de energía, como el metabolismo de aminoácidos o de los neurotransmisores cerebrales.

El estudio de diversas drogas sobre la concentración de las monoaminas cerebrales, serotonina y noradrenalina, y el transporte del aminoácido Valina a través del sistema de barrera cerebral fue realizado y se concluye lo siguiente:

- 1.- Los resultados de los psicofármacos ya conocidos coinciden con lo reportado por otros investigadores; la Imipramina (Tofranil) muestra elevación de las monoaminas en experimentos agudos y la reserpina disminuye la incorporación de la valina.
- 2,- Algunas de las fracciones de la Calaguala estudiada tienen efecto selectivo sobre la tasa de noradrenalina y serotonina; el CF₅ aumenta los niveles de serotonina y el CF₄ disminuye los de la noradrenalina; su efecto parece ser diferente en cuanto a su mecanismo de acción, el CF₅ a nivel del proceso de transporte y el CF₄ a nivel del metabolismo propio de las fracciones en estudio.
- 3.- Una dilucidación clara del proceso íntimo de acción se hace necesario estudiando la velocidad de recambio de las monoaminas, y el proceso de transporte de sus aminoácidos precursores, tanto in vitro como in vivo.

- 4.- Estudiar el efecto de las fracciones de la Calaguala, sobre los neurotransmisores, en forma combinada con drogas conocidas.
- 5.- Con este estudio se podrá pensar en la aplicación clínica de drogas hasta hace poco desconocidas, fracciones de la Calaguala, en forma aislada o combinadas.

BIBLIOGRAFIA .

- Ajuraguerra, J.- Monoaminés et Systeme Nerveux Central
1962 S.A. Symposlum
- Ansell G.B. and Beeson M.F.A. - Rapid and sensitive Procedure for the
1968 combined assay of Noradrenaline, Dopamine and Seroto—
nin in a single Brain sample; Reprint from Analyt, Bio-
chem 23:2
- Aprison, M.H. and Higtgen, J, M, Neurochemical correlates of behavior
1966 V, Differential effects of drugs on approach and avoidance
behavior in rats WI related changes in brain serotonin
and norepinephrine. Recent Advances in Biol. Psychiatry 1
87-100
- Aprison, M.H. Research approaches to problems in mental illness; brain
1965 neurohumor-enzyme systems and behavior, Prog. Brain Res,
16, 48-20
- Beauvallet, M. Fugazza, J and Solier, MJ. Journal of Physiology
1962 (Paris) 54:289
- Bogdanski, D.F. Pletscher, A. Brodie/ B.B. and Udenfriend, S. identifi-
1956 cation and assay of serotonin in brain J. Pharmac. Exp-
Ther. 117: 82:88
- Broadley, K, J. And Roberts D.J. - The influence of Antidepressant Drugs an
Akinesia Produced in Mice by Intracistornally Administered
Noradrenaline, Dopamine and Noradnamine Experimental.
15: B07- 803
- Brodie ,B.B. Comer, M.S. Costa E. and Dlabac, A. The role of brain setoto-
1966 nin in the mechanism of the central action of reserpine.
J, Pharmac exp. ther. 152:340-349
- Brodie, B.B. Towich E. G. kuntzman R. y Shore, P.A. - Possible interrelations
1957 ship between release of brain serotonin and noradrenalin
by reserpine. Science 125:1293

- Bunney, W E. Jr. and Davis J.M. Norepinephrine in Depressive Reactions.
1965 arch Gen Psychiat 13: 413-494.
- Carlsson, K. and Lindquist M. Effect of chlorpromazine zine or haloperidol on
formation of 3-methoxytyrimine and normetanephine in mouse brain.
196' Acta Pharmacol. 20:140
- Clark, W.G. - Studies an inhibition of L-Dopa descarboxilasa, in vivo and
1959 in vitrio. Pharm. Rev. 11:330
- Costa E. and Brodie B.B. Concept of Nerepineph ine in Depressive Reactions
1965 Arch Gen Psychiat 13: 483-494
- Corradi H, Fuxe H. Hakfelt T. - A posible Role Played by Central Monoami-
1967 nes Neurones in Thermo-Regulation. Acta Physiol, Scan-
dinava 71: 224-232
- Chang, C.C. A sensitive method for spectrophoto-fluorometric assay of
1964 catecolamines. Int. J. Neuropharmac. 3:643-649
- Euler U.S., Von, Lishajke F. and Stjarne L. Cathecolamines an Adenosine
1963 triphosphate in Adrenergic Nervo granulos. Acta Physiol.
Scand. 59: 495.
- Faillace, L.A.- Comp. Psychiat; 7:13
1966
- Flemingm R.M., . clark W.G. FentserE.D. And ToWne J.C. Single
extraction method for the simultaneous flourometric
determinaron of serotonin, dopamine and norepinephrine in
brain. Anal. Chem 37, 692-696
- Freud, S. Breuer, J. Studien Liber Hysterie. Viena: Deuticke.
1895.
- Friedhoff A. J. The role of catecholamines in Specific Psychiatric Disorders
1960 Res. publ. ass. ress. New Ment. Diss. 43:366-70
- Gey, K.F., and Pletscher A.: Influence of chlorpromazine and chlorprothi-
1961 xene on the cerebral metabolism of 5 hydroxytryptamine,
narepiñephine dopamine. J.Pharmacol Exp. Ther 122:10

- Giarman, N.J.: Antidepressant drugs. In *Drugs Pharmacology in Medicine*, 1965, edited by J.R. Dipalma, McGraw-Hill Inc. New York p. 356
- Glowinski, J. And Axelrod, J. Effects of drugs on the disposition of H³ norepinephrine in the rat brain. *Pharmacol. Rev.*, 18:775
1966
- Guth, P.S, and Spirtes, M. I, the phenothiazine tranquilizers: Biochemical and biophysical actions. *Int. Rev. Neurobiol* 7: 231
- Guroff G. and Udenfriend, S. Studies on Aromatic Amino Acid Uptake by Rat Brain in vivo, *J. Biol. Chem.* 237:803
1962
- Guroff G. King W. and Udenfriend, S. The uptake of Tyrosine by rat brain in vitro. *J. Biol Chem*, 236:1773
1961
- Horvath A., Alvarado F., Szocs J., Alvarado de Z, y Padilla G, Metabolic effects of Calagualine, an Antitumoral Saponin of *Polypodium leucotomos*. *Nature* 214:1256
1967
- Horvath, A, Paredes V, y Padilla G. Comunicación Personal.
1969.
- Hanson L.D.F, Evidence that Central Action of Amphetamine is Mediated Via Catecholamines; *Psychopharmacologia* 9:78-80
1966
- Hoffer A. ET. Al. Schizophrenia a new Approach. *U. Mental Sci.* (Engl. 100: 29)
1954
- Hollister L. E. Chemical Psychoses, L.S.D. and related drugs Ed.I. Newton Kinglemass.
1967
- Hollister L.E. Urinary Catecholamines Excretion. Following L.S.D. in man; *Psychophat. (Berl)* 11, 297-275.
1967
- Lajtha A. Blasberg R. and Levi G. Significance of Changes of Plasma Aminoacids Patterns, Rutgers Univ. Press.
1968
- Levi G, - Brain Barrier Systems Conference, Progress in Brain Research. Vol. 30 (Edited by A. Lajtha and D. H. Ford) p.219. Elsevier Publishing Co. Amsterdam.
1968

- Maickel R.P. Raymond H.C. Jr. Saillant J. and Miller F.P. - Method for determination of Serotonin and Norepinephrine in discrete areas of Rat Brain. Laboratory of Psychopharmacology. Indiana University, Blomington Ind. U.S.A.
1967
- Maickel R.P. Cox. R.H.Jr. Saillant J. and Miller F.P, Effect of various drugs On serotonin (5HT) and norepinephrine (NE) in discrete areas of rat brain. Fed. Proc. 26:708
1967.
- MC. Lennan H. Synoptic Transmission E. Saunders and Co. Philadelphia
1963.
- Montagus. K.A. Biochemical Journal 71:91
1959
- Pletscher A., Gey K.F. Drug induced alteration of the Metabolism of cerebral monoamines, Monoamines et systeme nerveux central. p,105 Edit. J. de Ajuraguerra, Ginebra
1962
- Pletscher A. Monoamine oxidase inhibitors Pharmacol. Rev. 18:121.
1966
- Pletscher A. Zentrale wirkungsmechanismen von psychopharmaka en: Funktionen a blaue unter emotionellen belastungen p 39 Edit IC. Fellingenger, Basilea Nueva York Karger
1964
- Pscheidt G, R. Monoamine Oxidase Inhibitors. Int. Rev. Neurobiol 7:191-229
1966
- Robitzek, E.H. Selikoff I.J. Ornstein, G.G. Chemotherapy of human tuberculosis with hydrazine derivatives of isonicotinic acid. Quart Bukk Sea view Hosp. 13:27
1952
- Roberts D.J. Broadley X.J, Treatment of Depression Lancet, 1: 7397 1965
- Rosecrans J.A. Lovell L.A, Friedman D.X. Effects of L.S.D. on Metabolism of brain 5 hydroxytryptamine. Biochem Pharm. 16:2011-202.
1967

- Rinne U. K. Sonninen V, Helminen H. Ultrastructure alteration and changes of the neurosecretory Catecholamines Nerve Endings in Median Eminence of the Rat after Oxypertine Injections
1967 Med Pharmacol. EWP, 17:103-118
- Schmidt K.F. Roth R, H, Interaction of Psychotropic Drugs with Agents Employed in Clinical Anesthesia, Clin. Anesth. 3:59-86
1967
- Singh P. Poirier J. Búa Cher R. Effects of IMAO on the concentration of Dopamine and Serotonin in the Striatum with and without Unilateral Brainstem lesion, Cadad J. of Physiol Pharm.45: 897.
1967
- Snyder S.H, Axerod J, and Zweig M. A sensitive and specific fluorescence assay for tissue serotonin. Biochem pharmac. 14:831 835
1965
- Symposium on Catecholamines, Pharm Review 11: 1969
- Theonen H. Georold M Haefly W and Huesllimann A. Norepinephrine Depletion and anty hypertensive Effect of 4 Methoxy 3, 5 Dihydroxy-Phenilaline Experimental 15:2
1968.
- Vanable J.W. Jr. - An ninhydrin reaction giving a sensitive quantitative fluorescence assay for 5 hydroxytryptamine. Anal Biochem 6 393-403
1963
- Vendsalu A. Studies on Adrenaline and Noradrenaline in human plasma. Acta Physiol Scand. 49 Sup. 173.
1960
- Vogt. M. Research Approaches to Psychiatric Problems. Symposium: 33-44 ed. Grune and Stratton.
1962
- Wise C. D. Ruelius H. W. The binding of Serotonin in Brain: A study "In Vitro" of the influences of Psychochemical factors and Drugs, Biochem. Pharm. 17:617-631.**

Wolley D. y, Shaw E. - A biochemical and Pharmacological suggestion
1954 about certain mental disorders. Science (EE UU.)
119-587

Wurtman R.J. Catecholamines; New Engl. J. Med 273:637
1965

Zeller E.A, t Barsky J, Fouts, J.R. Kincheimer w ,F, Van Orden, L.S.-
Influence of isonicotinic acid hidra zida (INH) and I-
isonicotlnyl-2-isopropyl hidrazides (IIH) on bacterial
on mammalian enzymes. Experientia 8/9:349.